

Factores técnicos, de estudio y diagnóstico aplicados a la patología linfoide.

Encuesta a 47 patólogos españoles.

T. ALVARO-NARANJO*, M.A. PIRIS-PINILLA** Y E. CAMPO-GÜERRI***

*Servicio de Patología. Hospital Verge de la Cinta. Tortosa. ** Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. *** Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Provincial. Barcelona.

SUMMARY

Technical, diagnostic and research factors applied to lymphoid pathology. A survey of the opinion of 47 spanish pathologists.

It is hard to reach firm agreement on the diagnosis of lymphoproliferative syndromes, due to the continuous appearance of new techniques, the emergence of new entities and even new forms of classification. This study sets out the findings of a survey aimed at showing how spanish pathologist work within this field. On the 150 questionnaires that were sent out, 50 (33%) were returned, 47 of which were correctly filled in. The most outstanding differences between pathologists who concentrate on lymphoid pathology and general pathologists arise within the following parameters: belief the molecular biology studies are necessary, participation in IQ quality control systems, the realization of more than 6 sections in each biopsy, the systematic freezing of specimens, the availability of adequate clinical information, and discussing case history with the doctor concerned. The REAL classification system of lymphomas is the most widely used. It is suggested that reference laboratories for molecular pathology be created.

Key words: Lymph nodes. Tissue processing. Lymphoma. Hematopathology.

INTRODUCCION

En los últimos años, el uso continuado de técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular han ayudado a resolver gran número de controversias planteadas en el campo de la Hematopatología y han permitido el reconocimiento de nuevas entidades clínico-patológicas. Además, dichos estudios han supuesto el punto de apoyo en la modernización de antiguos protocolos y en la actualización de nuevos criterios diagnósticos. Por otra parte, la generalización del uso de punción aspiración con aguja fina (PAAF) en ganglio linfático ha permitido conseguir un elevado rendimiento de la técnica en manos expertas y constituye una valiosa herramienta en la monitorización del seguimiento, recaídas y transformaciones de los procesos linfoproliferativos.

El estudio de la biopsia de ganglio linfático y otros tejidos linfoides requiere una especial atención a los factores técnicos implicados en la fijación, procesamiento, corte y tinción del tejido. Asimismo, la disponibilidad del material en condiciones especiales es fundamental para permitir la realización de algunos estudios diagnósticos, como ocurre con el material estéril apto para cultivo microbiológico o la congelación de tejido para poner de manifiesto determinados antígenos o realizar algunas técnicas de biología molecular.

La importancia de una correcta manipulación del tejido, con una adecuada distribución del mismo para la realización de técnicas convencionales y especiales, es puesta de manifiesto por la literatura científica (1-5). Sin embargo, las continuas novedades técnicas, la aparición de nuevas entidades e incluso de nuevas clasificaciones, hacen difícil la consecución de un consenso sólido entre los patólogos en el diagnóstico de síndromes linfoproliferativos, su correlación con el comportamien-

Correspondencia: Dr. Tomás Alvaro-Naranjo. Servicio de Patología. Hospital Verge de la Cinta. c/ Esplanetes, 44-58. 43517 Tortosa. Tarragona.

Tabla I. Tipo de hospital, volumen de patología anual y experiencia.

Tipo de hospital (camas)	Biopsias/piezas quirúrgicas	Citologías / PAAF	Biopsias/ PAAF pat. linfoide	Años de experiencia	Especial dedicación linfoide
<200 13%	<3000 15%	<4000 21%	<20 11%	<4 13%	Si 51%
2-400 30%	3-6000 19%	4-10000 24%	20-50 23%	4-8 19%	No 49%
>400 57%	>6000 66%	>10000 55%	>50 66%	>8 68%	

to clínico y la respuesta al tratamiento (6).

El presente artículo pretende contribuir al conocimiento de la medida en que la introducción de nuevas tecnologías y la aplicación de recientes nociones en el campo de la Hematopatología, han supuesto la adopción de nuevas actitudes por parte de los patólogos españoles en el terreno diagnóstico y clasificatorio. Este trabajo se basa en la información extraída de una encuesta cuyos objetivos persiguen conocer los métodos de trabajo del patólogo español, incluyendo factores técnicos y de manipulación de la biopsia de ganglio linfático, bazo, médula ósea y síndromes linfoproliferativos extranodales, tipo de fijador empleado, realización de estudios especiales, sistemas de diagnóstico y de clasificación.

MATERIAL Y METODOS

Se ha realizado una encuesta titulada "Factores técnicos, de estudio y de diagnóstico aplicados a la patología linfoide", en donde se especifican los objetivos perseguidos, encaminados a conocer los tipos de fijador habitualmente utilizado, estudios especiales y sistemas de diagnóstico y clasificación.

La encuesta consta de 40 preguntas, que incluyen la investigación de las características del grupo de trabajo, información clínica, protocolos, fijación, examen macroscópico, condiciones de estudio, técnicas convencionales, cultivos microbiológicos, PAAF, extensiones, estudios en congelación, análisis inmunofenotípico y molecular, relación con otros centros e instituciones, sistemas de diagnóstico y clasificación.

Se han distribuido 150 cuestionarios a los patólogos asistentes a la XXXIII Reunión Científica del Club Español de Linfomas (CEL) (9 noviembre de 1995, Tortosa) y el Segundo Curso de Hematopatología (10-11 noviembre 1995, Tortosa), incluyendo un apartado que investiga la asistencia habitual a las reuniones científicas del CEL o una especial dedicación a la patología linfoide.

De los 150 cuestionarios distribuidos se han entregado 50 (33%), de los cuales 3 han sido eliminados por estar rellenos de forma irregular o incompleta, quedando para análisis definitivo 47 cuestionarios co-

rectamente cumplimentados.

Se han sometido a análisis estadístico las respuestas válidas, considerando dos grupos, uno de ellos global y el otro comparando las respuestas emitidas por patólogos con especial dedicación a la patología linfoide y/o asistencia habitual a las reuniones del CEL (24,51%) y aquellos que no lo hacen (23,49%). Finalmente, la encuesta incluye un apartado para hacer notar consideraciones de interés.

RESULTADOS

Los datos referentes al ámbito de trabajo de los patólogos participantes en la encuesta su nivel de experiencia se muestran en tabla I.

La tabla II recoge cómo un elevado porcentaje de patólogos cuenta con información clínica adecuada y generalmente comenta la historia con el clínico (77% en ambos casos). Menos veces se dispone de un diagnóstico clínico provisional (49%) o se revisa el hemograma en caso de sospecha de leucemia (45%). Un 55% de los patólogos revisa habitualmente la médula ósea con el hematólogo y sólo un 15% el ganglio linfático.

Antes de la biopsia de ganglio linfático no se realiza nunca PAAF en un 15%, a veces 55% y casi siempre 30%. El paciente no es nunca tratado sólo con el estudio de PAAF en el 80% de las instituciones y pocas veces el 20%.

El 57% de los servicios de Patología dispone de un protocolo escrito de manipulación de ganglio linfático

Tabla II. Datos clínicos y hematológicos.

	SI	NO
Información clínica adecuada	77%	23%
Diagnóstico clínico provisional	49%	51%
Comentario de la hª con el clínico	77%	23%
Revisión del hemograma (leucemia)	45%	55%
Revisión médula ósea (hematólogo)	55%	45%
Revisión ganglio linfático (hematólogo)	15%	85%

y médula ósea. Un 77% realiza descripción macroscópica exhaustiva de la biopsia de ganglio linfático, incluyendo dimensiones, cápsula, superficie de corte, necrosis, etc. El tejido es recibido en fresco por el 78% y ya en líquido fijador por el 22%.

En caso de identificación de necrosis macroscópica, el 53% de los patólogos realiza cultivo microbiológico de forma habitual. El 65% estudia improntas de ganglio linfático de forma sistemática.

El tipo de fijador más usado es formol tamponado (87%), seguido de solución B-5 (64%). El número de cortes solicitados de un síndrome linfoproliferativo es de 3 a 6 en 55% y más de 6 en 32%. Las técnicas convencionales de tinción más habituales son H-E (100%), Giemsa (51%) y PAS (48%).

El 47% de los especialistas selecciona habitualmente material para congelación y el 98% realiza estudios inmunohistoquímicos (IHQ) siempre o casi siempre. El 13% dispone de técnica IHQ a través de laboratorio de referencia. El panel disponible de Ac en parafina de patología linfóide consta de menos de 5 Ac (24%) de 5 a 10 Ac (48%) ó más de 10 Ac (28%), realizando el 45% estudios IHQ en congelación en caso de ser necesario. Un 61% de los servicios participan en algún esquema de control de calidad IHQ. El estudio IHQ resulta de gran ayuda o varía la impresión inicial muy pocas veces (13%), a veces (74%) o a menudo (13%). Los Ac más utilizados son CD20 (100%), CD45RO (83%), CD45 (67%) y CD15 (55%). CD30 lo utiliza habitualmente el 47% y CD3 el 44%. Cadenas ligeras de Ig las utiliza el 25%, CD68 el 19% y bcl-2 el 11%. Con una frecuencia inferior al 8% se utilizan CD21, p53 y Ki67.

Un 35% de los encuestados considera necesaria la realización de estudios de biología molecular, pero sólo un 7% dispone de la capacidad de realizar estudios de biología molecular, citogenética o citometría de flujo.

El 89% de los patólogos hace habitualmente descripción microscópica en los informes definitivos de

síndromes linfoproliferativos y un 4% utiliza protocolos estandarizados. El tiempo medio de emisión de los informes es de 4-7 días en 64% y más de 8 días el 32%. Los casos son remitidos a un especialista de otra institución con frecuencia por el 28%.

El sistema de clasificación de linfomas más utilizado es la REAL clasificación (7) (75%), seguido por la Working Formulation (8) (49%) y la clasificación de Kiel (9) (33%). En 62% de los hospitales son tratados más del 85% de los pacientes diagnosticados y en el 22% de los hospitales menos del 60%.

El apartado para hacer notar consideraciones de interés recoge fundamentalmente la idea de la disponibilidad para hospitales pequeños de centros de referencia, altamente cualificados para el estudio de la patología linfóide.

Las diferencias más notables detectadas entre patólogos con especial dedicación a la patología linfóide y patólogos generales quedan reflejadas en la tabla III. Aparte del volumen de patología linfóide (más de 50 casos/año 83% vs. 47%), las seis cuestiones con mayores discrepancias, ordenadas de mayor a menor, han sido las siguientes: consideración de los estudios de biología molecular como necesarios (57% vs. 10%), participación en sistemas de control de calidad IHQ (79% vs 40%), realización de más de 6 cortes de síndromes linfoproliferativos (50% vs. 13%), congelación de material por sistema (62% vs. 30%), disponibilidad de información clínica adecuada (92% vs 60%) y comentar la historia con el clínico (92% vs. 60%).

DISCUSION

El estudio y diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos exige una técnica de laboratorio, convencional y especial, de alta calidad (1-5) y una estrecha colaboración interdisciplinaria entre diferentes áreas de conocimiento: Patología, Hematología, Oncología, Biología, Cirugía, Radiología, Microbiología, etc.

Cuestión	Patólogo general	Especial dedicación
Más de 50 casos/año patología linfóide	47%	83%
Información clínica adecuada	60%	92%
Comentar la hª con el clínico	60%	92%
Revisión médula ósea con hematólogo	43%	67%
Revisión ganglio linfático con hematólogo	4%	33%
Protocolo escrito macroscópico	43%	71%
Cultivo microbiológico (caso con necrosis)	43%	62%
Improntas de ganglio linfático	54%	75%
Más de 6 cortes por caso estudiado	13%	50%
Selección de material para congelación	30%	62%
Sistema de control de calidad IHQ	40%	79%
Considerar biología molecular necesaria	10%	57%

Tabla III. Discrepancias más notables detectadas entre patólogos generales y aquellos con especial dedicación a la patología linfóide.

De la encuesta objeto de este artículo se desprende que la muestra de patólogos españoles representados suelen disponer de la suficiente información clínica a la hora de evaluar sus casos y que mantienen un nivel aceptable de comunicación clínica. Sin embargo, apenas la mitad estudia el hemograma en caso de sospecha de leucemia o revisa la médula ósea con el hematólogo de forma habitual, siendo pocos los que revisan conjuntamente con este último la biopsia de ganglio linfático. A este respecto debe recordarse que se han establecido criterios específicos diagnósticos de LLC (>5000 linfocitos/mm³ (10) y que la visión conjunta de la biopsia e impronta de médula ósea con el citohematólogo puede resultar de gran interés y ayuda (11,12).

Los estudios de PAAF están bastante arraigados en la práctica diaria, aunque sólo excepcionalmente los pacientes son tratados exclusivamente con el diagnóstico citológico. El uso de la PAAF en patología linfoide está ampliamente recogido en la literatura (13,14), sobre todo para estadiaje y constatación de recidivas (15), mientras que el diagnóstico inicial y tipificación del linfoma deben realizarse sobre material de biopsia.

En bastantes casos no existe protocolo escrito de manipulación del tejido y, aunque la mayoría de los patólogos reciben el material en fresco, casi la mitad no solicita cultivo microbiológico si identifica necrosis en el estudio macroscópico, aproximadamente un tercio no realiza improntas y más de la mitad no selecciona material para congelación. Merece la pena destacar que la solicitud de cultivo, así como la realización de improntas (1) pueden hacer por sí solas, o facilitar en gran medida, el diagnóstico. El tejido congelado constituye una fuente de material insustituible para determinados estudios citoquímicos, inmunocitoquímicos y de análisis genético (1,4).

El fijador más utilizado es el formol tamponado, seguido por solución B-5. Resulta llamativa la diferencia en el número de cortes solicitado por caso entre patólogos con especial dedicación a la patología linfoide y aquellos que no lo hacen. La técnica convencional universal es para todos la H-E y sólo la mitad solicitan un Giemsa de forma rutinaria. Esta última técnica es la usada de forma preferente por algunas escuelas, como la de Lennert (16), por permitir una buena diferenciación citoplasmática.

La investigación del inmunofenotipo de los síndromes linfoproliferativos es prácticamente universal y generalmente en el laboratorio propio, sirviendo de ayuda o variando la impresión inicial en buen número de casos. Los Ac Mo más utilizados son aquellos orientados a la identificación de estirpe celular (CD20, CD45RO, CD45 y CD15). CD30 es utilizado por menos de la mitad de los patólogos encuestados y cadenas ligeras de las Ig por un cuarto. CD21, bcl-2, p53 y Ki67 son escasamente utilizados. La literatura científica recoge amplias revisiones del inmunofenotipaje de los linfomas (17). CD30, relativamente poco utilizado, es

un Ac de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de casos con morfología de enfermedad de Hodgkin o linfoma anaplásico de células grandes (18). La identificación de poblaciones monoclonales linfoides probando restricción de cadenas ligeras en procesos linfoproliferativos B es un arma diagnóstica de primera magnitud (19), aunque probablemente las dificultades técnicas en su demostración justifiquen su escaso uso (20). bcl-2 está presente en las células tumorales de la mayoría de los linfomas foliculares y ausente de los centros germinales hiperplásicos (21), pero además es útil en los diagnósticos diferenciales entre linfoma centrofolicular vs. colonización folicular por linfoma MALT, linfoma de célula grande MALT o nodal y linfoma de Burkitt vs. linfoma de célula grande con patrón en cielo estrellado (22). La presencia de p53 ha sido demostrada en enfermedad de Hodgkin casi de forma universal (23), así como en linfomas no Hodgkin (24), siendo rara su expresión en células no neoplásicas. El número de células tumorales positivas con Ki67 se correlaciona directamente con el grado de malignidad del linfoma (25).

De especial interés resulta la discrepancia en la consideración como necesarios de los estudios de biología molecular por parte del patólogo general y aquel dedicado especialmente al estudio de la patología linfoide, a pesar de que, de momento, son muy pocos los que tienen acceso a dichas técnicas, al igual que ocurre con la citogenética y la citometría de flujo. Actualmente es fácil encontrar magníficas revisiones de la aplicación de la biología molecular al estudio y diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos (26-28). Tal vez el sistema público debería considerar el impacto y la utilidad de estas técnicas para ofertarlas al sistema sanitario de forma centralizada, máxime teniendo en cuenta su papel primordial en el diagnóstico diferencial de algunas entidades conflictivas, como ocurre entre linfoma linfoblástico y forma blástica de linfoma de células del manto o linfoma de células grandes, LLC o linfoma de células del manto, linfoma T periférico y linfoma B rico en células T, casos todos ellos en que un error diagnóstico puede conllevar una actitud terapéutica inadecuada.

Apenas a un año de su publicación, el sistema de clasificación de linfomas más utilizado por los patólogos españoles es la REAL clasificación (7) (75%), que se simultanea en buen número de casos con la Working Formulation (8), siendo pocos los que utilizan habitualmente la clasificación de Kiel actualizada (9) para la catalogación de linfomas. Probablemente la rapidez y facilidad en la adopción de la REAL puedan ser entendidas como un reconocimiento de la misma, no como una nueva clasificación, sino como una que recoge, organiza y sistematiza información previamente existente, ya conocida por la mayoría de los patólogos españoles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. M^a Teresa Salvadó por su inestimable colaboración en la obtención de datos.

RESUMEN

Las continuas novedades técnicas, la aparición de nuevas entidades e incluso nuevas clasificaciones, hacen difícil la consecución de un consenso sólido en el diagnóstico de síndromes linfoproliferativos. Se estudian los métodos de trabajo del patólogo español en este campo. De los 150 cuestionarios distribuidos se han entregado 50 (33%), quedando para análisis definitivo 47 correctamente cumplimentados. Las diferencias más notables detectadas entre patólogos con especial dedicación a la patología linfoide y patólogos generales son la consideración de los estudios de biología molecular como necesarios, participación en sistemas de control de calidad IHQ, realización de más de 6 cortes por biopsia, congelación de material por sistema, disponibilidad de información clínica adecuada y comentar la historia con el clínico. El sistema de clasificación de linfomas más utilizado es la REAL clasificación. Se sugiere la creación de laboratorios de referencia de patología molecular.

Palabras clave: Ganglio linfático. Procesamiento de tejidos. Linfoma. Hematopatología.

BIBLIOGRAFIA

1. Banks PM. Technical factors in the preparation and evaluation of lymph node biopsies. En: Knowles DM ed. Neoplastic hematopathology. Williams & Wilkins 1992; 367-384.
2. Beard C, Nabers K, Bowling MC, Berard CW. Achieving technical excellence in lymph node specimens: an update. Lab Med 1985; 16: 468-475.
3. Collins RD. Lymph node examination. What is an adequate workup? Arch Pathol Lab Med 1985; 109: 796-799.
4. García del Moral R, Lardelli P, Navarro N. Métodos de estudio del sistema hematopoyético y linfoide. En: García del Moral R. Laboratorio de Anatomía Patológica, Interamericana-McGraw-Hill 1993.
5. Alvaro T. Factores técnicos en el estudio de síndromes linfoproliferativos. En: Alvaro-Naranjo T ed. Segundo Curso de Hematopatología. Tortosa 1995: 153-162.
6. Cousar JB. Surgical pathology examination of lymph nodes. Practice survey by American Society of Clinical Pathologists. Am J Clin Pathol 1995; 104: 126-132.
7. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American Classification of lymphoid neoplasm: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84: 1361-92.
8. Project Tn-HIpc. National Cancer Institute sponsored study of classifications on non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. Cancer 1982; 49: 2112-2135.
9. Stansfeld AG, Diebold J, Kapanci Y et al. Updated Kiel Classification for lymphomas. Lancet 1988; 1: 292-293.
10. Cheson BD, Bennett JM, Rai KP et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia. Recommendations of the NCI-Sponsored Working Group. Am J Hematol 1988; 29: 152-163.
11. Romagosa V. Biopsia de médula ósea. Criterios generales de evaluación. En: Alvaro Naranjo T ed. Segundo Curso de Hematopatología. Tortosa 1995; 87-100.
12. Bone marrow specimen processing. En: Brunning RD, McKenna RW. Atlas of tumor pathology. Tumors of the bone marrow. Armed Forces Institute of Pathology. Washington 1994; 475-490.
13. Cardillo MR. Fine-needle aspiration cytology of superficial lymph nodes. Diagn Cytopathol 1990; 5: 166-173.
14. Carter TR, Feldman PS, Innes DJ, Frierson HF, Frigy AF. The role of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphoma. Acta Cytol 1988; 32: 848-853.
15. Pitts WC, Weiss LM. The role of fine needle aspiration biopsy in the diagnosis and management of hematopoietic neoplasms. En: Knowles DM ed. Neoplastic hematopathology. Williams & Wilkins, Baltimore 1992: 385-406.
16. Lennert K ed. Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas (based on the Kiel classification). New York. Springer-Verlag 1981: 119.
17. Norton AJ, Isaacson PG. Lymphoma phenotyping in formalin-fixed and paraffin wax-embedded tissues. I. Range of antibodies and staining patterns. Histopathology 1989; 14: 557-579.
18. Leoncini L, del Vecchio MT, Kraft R et al. Hodgkin's disease and CD30 positive anaplastic large cell lymphomas - a continuous spectrum of malignant disorders. A quantitative morphometric and immunohistologic study. Am J Pathol 1990; 137: 1047-1057.
19. Stetler-Stevenson M, Medeiros LJ, Jaffe ES. Immunophenotypic methods and findings in the diagnosis of lymphoproliferative diseases. En: Jaffe ES ed. Surgical pathology of the lymph nodes and related organs. Saunders, Philadelphia 1995; 22-57.
20. Acevedo M, Muñoz E. Linfadenopatías reactivas y enfermedades linfoproliferativas atípicas. Histopatología y diagnóstico diferencial. En: Alvaro Naranjo T ed. Segundo Curso de Hematopatología. Tortosa 1995; 33-68.
21. Gaulard P, d'Agay MF, Peucmaur M et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. Am J Pathol 1992; 140: 1089-1095.
22. Píris MA. Patrones inmunohistológicos básicos en las proliferaciones del ganglio linfático. En: Alvaro Naranjo T ed. Segundo Curso de Hematopatología. Tortosa 1995; 69-78.
23. Alvaro T, Salvadó MT, Font LL, Gumá J, Bosch R, Contreras E. Significado pronóstico de la proteína p53 en enfermedades de Hodgkin. Neoplasia 1996; 13: 1-4.
24. Pezzella F, Morrison H, Jones M, Gatter KC, Lane D, Harris AL, Masson DY. Immunohistochemical

- detection of p53 and bcl-2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1993; 22: 39-44.
25. Houmand A, Abrahamsen B, Tinggaard Pedersen N. Relevance of Ki67 expression in the classification of non-Hodgkin's lymphomas: a morphometric and double-immunostaining study. *Histopathology* 1992; 20: 13-20.
 26. Ratech H. The uses of molecular biology in hematopathology. Oncogenes as diagnostic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 381-384.
 27. Algara P, Piris MA. Aplicación de la genética molecular en el diagnóstico de tumores linfoides. En: Alvaro Naranjo T ed. *Segundo Curso de Hematopatología*. Tortosa 1995: 109-152.
 28. Medeiros LJ, Bagg A, Cossman J. Application of molecular genetics to the diagnosis of hematopoietic neoplasms. En: Knowles DM ed. *Neoplastic hematopathology*. Williams & Wilkins. Baltimore 1992; 263-298.